

مقایسه وضعیت ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال در سرطان مهاجم پستان توسط روش های ایمونوهیستوشیمی و هیبریدیزاسیون کروموزنیک درجا

دکتر فرشته انسانی*، دکتر مهسا کارگر**، دکتر مسعود دونلو***

دکتر گیتی ایروانلو*، دکتر زهرا خزائی پور****

چکیده:

زمینه و هدف: ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (HER-2) در تغییر و تبدیلات سلولی و ایجاد تومور نقش مهمی دارد. وجود ژن HER-2 در سرطان پستان نشانه ای است که بر مبنای آن می توان پیش بینی کرد که تومور به درمان هایی که بر پایه آنتروسیکلین ها بنا شده اند و نیز درمان هدفمند ضد HER-2 (Herceptin) حساس باشد.

مواد و روش ها: این بررسی به منظور مقایسه روش ایمونوهیستوشیمی (IHC) و هیبریدیزاسیون کروموزنیک درجا (CISH) در ارزیابی وضعیت ژن HER-2 در ۳۸ بیمار مبتلا به سرطان مهاجم پستان نوع داکتال طراحی شده است. برای بررسی میزان توافق بین CISH و IHC، از روش آماری Pair Wise Grouped استفاده شد.

یافته ها: بین IHC و CISH در ارزیابی HER-2 در ۹۲/۱٪ هماهنگی وجود داشته است. ضریب توافق کاپا (Kappa Statistic) نشان دهنده هم خوانی عالی بین این دو روش است ($Kappa=0.839, P<0.001$).

نتیجه گیری: انجام CISH به عنوان یک روش مکمل IHC در ارزیابی وضعیت HER-2 در آن دسته از بیماران مبتلا به سرطان پستان که HER-2 در آنها به طور ضعیف مثبت است (2+) توصیه می شود.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال، ایمونوهیستوشیمی، هیبریدیزاسیون کروموزنیک درجا

زمینه و هدف

یک عضو از خانواده گیرنده های فاکتور رشد اپیدرمال است که در رشد طبیعی و تمایز آن نقش دارد.^۱ این مولکول یک

ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال
[Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2)]

نویسنده پاسخگو: دکتر فرشته انسانی

تلفن: ۸۸۹۵۸۶۰۰

Email: Fereshteh.Ensani@hotmail.com

* دانشیار گروه آسیب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش سیتولوژی انستیتو کانسر

** دستیار گروه آسیب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش آسیب شناسی

*** متخصص آسیب شناسی بالینی، آزمایشگاه پاتوبیولوژی دانش

**** استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش تحقیقات و آمار

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۰۳/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۱/۲۵

هزینه‌تر و قابل دسترس‌تر می‌باشد و در مطالعات مختلفی همخوانی IHC و CISH نیز گزارش شده است.^{۱۳و۸۷}

هدف این مطالعه، بررسی هم‌خوانی بین IHC و CISH در تشخیص کردن وضعیت HER-2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی، ۳۸ بلوک پارافینی از سرطان مهاجم داکتال پستان در بیماران زن که در آزمایشگاه دانش تشخیص داده شده بود، انتخاب شد. تشخیص بافت‌شناسی و درجه‌بندی آن بر روی برش‌های رنگ شده به روش هماتوکسیلین و ائوزین بر پایه روش استاندارد بلوم – ریچاردسون انجام شد. تمام نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪، فیکس شدند. جهت انجام IHC و CISH از بلوک‌ها، برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرون بر روی لام تهیه شده و ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ایمونوهیستوشیمی: جهت تعیین وضعیت HER-2 با استفاده از کیت (Dakocytomation, Glostrop, Denmark, Code K 5204) Hercep test انجام شد. لام‌ها در محلول گزیلول به مدت ۵ دقیقه، دیپارافینه شده و سپس در الکل مطلق ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه قرار داده شدند. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر قرار گرفته و پس از آن لام‌ها را در محلول ۰/۰۱ مولار بافر سیترات گذاشته و به مدت ۴۰ دقیقه در بن ماری با حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از شستشو، آنها را با ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیداز بلوک کننده (محلول ۳٪ هیدروژن پراکسید حاوی 15mmol/lit سدیم آزاید) به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم و پس از شستشو لام‌ها با محلول آنتی‌بادی ضد مولکول HER-2 انسانی به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس، از محلول ایجاد کننده رنگ به مدت ۳۰ دقیقه پوشیده شده و واکنش رنگی به واسطه مولکول ۳ و ۳ دی آمینوبنزیدين ایجاد گردیده شده است و در نهایت با هماتوکسیلین (رنگ زمینه) رنگ شدند.

بررسی وضعیت پروتئینی HER-2 در لام‌ها با استفاده از دستورالعمل کیت Hercep test صورت پذیرفت (جدول ۱).

در مجموع، یافته‌های IHC بر اساس وضعیت پروتئینی HER-2 بصورت منفی (۰ و +۱)، مثبت ضعیف (+۲) و مثبت قوی (+۳) گزارش گردیدند.

پروتئانکوژن است که روی کروموزم ۱۷ قرار دارد.^۲ بین این ژن و ژن neu gen در موش همولوگی زیادی وجود دارد، از این رو آن را تحت عنوان HER-2/neu و گاه آن را تحت عنوان C-erb-B2 نیز می‌نامند.^۱ این ژن حاوی اطلاعات ژنتیکی است که منجر به ساخت یک مولکول گلیکوپروتئینی به وزن 185-KD می‌شود.^۳ این پروتئین را P185 HER2 و یا به سادگی پروتئین HER2 و یا گیرنده HER-2 می‌نامند. این مولکول دارای سه بخش خارج سلولی، داخل غشائی و داخل سیتوپلاسمی است^۴ و در انتقال علائم مربوط به تحریک سلول توسط فاکتور رشد نقش اساسی دارد. بیان بیش از معمول این مولکول در ترانسفورماسیون سلولی و ایجاد تومور نقش دارد.^{۳و۱۳} بیان بیش از معمول این فاکتور با شدت زیاد در ۳۰٪-۲۰٪ سرطان مهاجم داکتال^۵ و ۶۰٪ سرطان داکتال درجاء^۶ و نیز در سایر تومورها مثل تومور مثانه، کولورکتال و سرطان غیر سلول کوچک ریه دیده می‌شود.

در بررسی‌های متعدد دیده شده است که در صورتی که HER2 مثبت باشد، پیش‌آگهی در آن دسته از بیماران که دارای متاستاز به غدد لنفاوی هستند بدتر است،^{۱۳و۸۷و۹۱} ولی ارزش پیش‌آگهی این فاکتور در بیمارانی که تومور، محدود به پستان بوده و متاستاز ندارند، مشخص نمی‌باشد.^۲

در صورتی که HER-2 مثبت باشد، تومور به درمان‌هایی که بر پایه آنتروسیکلین‌ها بنا شده‌اند، حساس‌تر است و ممکن است به درمان‌هایی که بر پایه تاکسن‌ها بنا شده‌اند، نیز حساس باشد.^{۱۲} مهمترین ارزش HER-2 در این است که نشانه‌ای است که می‌تواند نتیجه درمان با داروهائی که به طور اختصاصی به عنوان آنتی‌بادی بر علیه این مولکول وارد عمل می‌شوند را پیش‌بینی کند. داروی ضد HER-2، "Herceptin" است. این دارو اولین دارو در گروه درمان هدفمند است که برای زنان مبتلا به سرطان پستان که HER-2 آنها مثبت است، بکار می‌رود.^{۱۱و۱۴}

برای ارزیابی وضعیت HER-2، از روش‌های متفاوتی می‌توان استفاده کرد. IHC و هیبریدیزاسیون فلوروسنت درجا (FISH) [Fluorescence In Situ Hybridization، متداول‌ترین روش‌هایی هستند که مورد تأیید FDA می‌باشد.^{۱۴} هم‌خوانی بین روش FISH و IHC در مطالعات زیادی گزارش شده است، هر چند که FISH در حال حاضر حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش برای بررسی وجود HER-2 است.^{۹و۷}

از طرفی روش آلترناتیو FISH، روش CISH (Chromogenic In Situ Hybridization)، بسیار راحت‌تر، کم

جدول ۱- تفسیر رنگ پذیری تست Hercep

الگوی رنگ پذیری	امتیاز	ارزیابی بیان بیش از معمول پروتئین HER-2
عدم رنگ پذیری یا رنگ پذیری غشائی در کمتر از ۱۰٪ سلول های تومور	۰	منفی
رنگ پذیری خفیف در جزئی از غشاء در بیش از ۱۰٪ سلول های تومور	+۱	منفی
رنگ پذیری خفیف تا متوسط در کل غشاء در بیش از ۱۰٪ سلول های تومور	+۲	مثبت ضعیف
رنگ پذیری شدید در کل غشاء در بیش از ۱۰٪ سلول های تومور	+۳	مثبت قوی

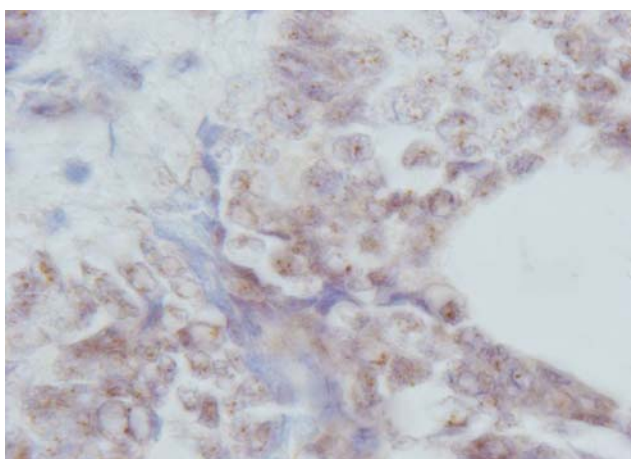
هیبریدزاسیون کروموزنیک در جا (CISH): بررسی CISH جهت مشخص کردن ژن HER-2/neu با استفاده از Zytodot SPEC HER-2 probe Kit (Zytovision Company, Germany) بر طبق دستور کارخانه سازنده انجام شد.

ابتدا لام هایی را که به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده بودیم را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در ترموبرایت (Thermobrite) قرار دادیم و سپس به منظور دیپارافینه کردن، در محلول های گزبلول و الکل با درجات متفاوت قرار داده و سپس مراحل زیر انجام گرفت:

لام ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول آماده سازی اولیه قرار گرفته و سپس در آب مقطر شسته شده و خشک شدند. در مرحله بعد، محلول پیپسین برای پروتئولیز روی لام ها قرار گرفته و آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اطاق در محفظه مرطوب گذاشته شدند. لام ها سپس با آب مقطر شسته شدند و به منظور دهیدراتاسیون در محلول الکل با درجات متفاوت گذاشته شدند. در مرحله بعد، لام ها را به پروب HER-2 در دمای ۹۴-۹۵ درجه سانتی گراد در ترموبرایت به مدت ۵ دقیقه قرار داده سپس آنها را با لامل پوشانده و در محفظه مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم تا در طول شب هیبریداسیون انجام شود. پس از غوطه ور کردن لام ها در محلول بافر شستشو در دمای ۷۵-۸۰ درجه، لامل را برداشته و پس از شستشو، لام ها را به مدت ۱۰ دقیقه با هیدرژن پراکسید مجاور کرده و سپس دو بار در محلول PBS شستشو دادیم. سپس لام ها را از محلول

بلوک کننده پوشانیده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده، پس از خارج کردن از محلول فوق با Mouse Anti-Digoxigenin به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق انکوبه کرده و سپس دوبار در محلول PBS شستشو دادیم. در مرحله بعد روی اسلایدها را با محلول HRP-Polymer Anti-Mouse پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده و سپس دوبار در محلول PBS شستشو دادیم. در مرحله نهائی لام ها را از محلول DAB پوشانده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده پس از شستشو در آب جاری، با همتوکسیلین مایر رنگ کرده و در محلول های الکل به درجات متفاوت دهیدراته کرده و سپس آنها را با لامل پوشانده و توسط نوری بررسی کردیم.

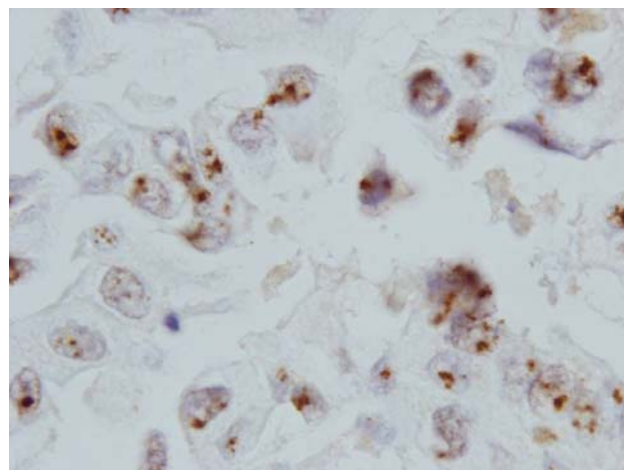
تفسیر نتایج CISH: وجود یک کپی از ژن به صورت یک نقطه قهوه ای رنگ داخل هسته سلول توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است. با استفاده از درشت نمائی ۴۰ این نقاط به راحتی قابل مشاهده می باشند. قبل از شمارش، ابتدا باید تمام لام را با درشت نمائی کم (عدسی ۱۰ یا ۲۰) مطالعه کرد. در کانون های نکروز تراکم سلولی و نیز هسته هایی که رنگ پذیری کم دارند، نباید شمارش صورت پذیرد. در هسته های طبیعی دیپلوئید بدون تقویت ژنی، دو نقطه گرد قهوه ای با حاشیه صاف در هر هسته مشاهده می شود. در صورتی که تقویت ژنی کم باشد، در هر هسته نقاط متعدد و یا خوشه های کوچک در هر هسته مشاهده می شود. خوشه های کوچک مشتمل بر نقاط نامنظم بوده که سطحی معادل ۵ نقطه را اشغال می کند (تصویر ۱).



تصویر ۱- CISH با تقویت ژنی کم

در صورتی که میزان تقویت ژنی زیاد باشد، تعداد زیادی نقطه و یا خوشه های بزرگ مشتمل بر بیش از ۵ نقطه در هسته

مشاهده می‌شود (تصویر ۲). در مجموع، یافته‌های CISH بر اساس تقویت ژنی به صورت منفی، تقویت ژنی کم و تقویت ژنی زیاد گزارش گردیدند.



تصویر ۲- CISH با تقویت ژنی بالا

بررسی آماری: برای بررسی آماری از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد. برای بررسی میزان توافق بین CISH و IHC، از ضریب توافق کاپا و روش Pair Wise Grouped استفاده شد. کاپا به میزان ۰/۴ و کمتر، نشانه عدم توافق، ۰/۴-۰/۸ نشانه توافق متوسط یا خوب و ۰/۸ و بیشتر نشانه توافق عالی در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۳۸ مورد سرطان داکتال مهاجم پستان در زنان به روش IHC و CISH مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سن بیماران 50.36 ± 11.61 (متغیر از ۳۰ تا ۸۱ سال) بود. ۵ تومور (۱۳/۲٪) دارای درجه بافت‌شناسی I، ۲۷ تومور (۷۱/۱٪) دارای درجه بافت‌شناسی II و ۶ تومور (۱۵/۸٪) دارای درجه بافت‌شناسی III بودند.

درجه هسته در ۲ تومور (۵/۳٪) I، ۲۸ تومور (۷۳/۷٪) II و ۸ تومور (۲۱/۱٪) III بوده است.

از ۳۸ مورد بررسی شده، ۲۰ تومور (۵۲/۶٪) فاقد تقویت ژنی با روش CISH و با HER-2 منفی در IHC (۰/۱+)، یک مورد (۲/۶٪) تقویت ژنی کم با روش CISH و با HER-2 مثبت ضعیف (۲+) در IHC و ۱۱ تومور (۲۸/۹٪) تقویت ژنی زیاد با روش CISH و با HER-2 مثبت قوی (۳+) در IHC بودند. در یک مورد (۲/۶٪)، HER-2 در IHC مثبت ضعیف (۲+) بوده ولی فاقد تقویت ژنی در CISH بوده است. هیچ توموری با پروتئین

HER-2 مثبت قوی (۳+) نبوده است که فاقد تقویت ژنی در CISH باشد (جدول ۲).

جدول ۲- بررسی توافقی بین دو روش IHC و CISH

کل	CISH			IHC	
	زیاد	کم	منفی		
۱۵	۰	۱	۱۴	تعداد	صفر
۳۹/۵	۰/۰	۲/۶	۳۶/۸	درصد کل	
۷	۰	۱	۶	شمارش	یک
۱۸/۴	۰/۰	۲/۶	۱۵/۸	درصد کل	مثبت
۳	۱	۱	۱	شمارش	دو
۷/۹	۲/۶	۲/۶	۲/۶	درصد کل	مثبت
۱۳	۱۱	۲	۰	شمارش	سه
۳۴/۲	۲۸/۹	۵/۳	۰/۰	درصد کل	مثبت
۳۸	۱۲	۵	۲۱	تعداد	کل
۱۰۰/۰	۳۱/۶	۱۳/۲	۵۵/۳	درصد کل	

نتایج دو روش بررسی در ۹۲/۱٪ (۳۵ مورد) در رابطه با نتایج منفی (۱+)، صفر) و مثبت (۲+، ۳+) در IHC در مقایسه با عدم تقویت ژنی و وجود تقویت ژنی (کم و زیاد) به دست آمده در روش CISH دارای توافق بودند (جدول ۳).

از سوی دیگر از ۱۶ موردی که IHC مثبت بوده است (۲+، ۳+) در ۱۵ مورد (۹۳/۸٪) در CISH مثبت بوده (تقویت ژنی کم و زیاد) و تنها در یک مورد (۶/۳٪) تقویت ژنی وجود نداشته است.

جدول ۳- بررسی توافقی بین گروه‌بندی دو روش IHC و CISH

کل	CISH		IHC	
	مثبت	منفی		
۲۲	۲	۲۰	تعداد	منفی
۵۷/۹	۵/۳	۵۲/۶	درصد کل	
۱۶	۱۵	۱	شمارش	مثبت
۴۲/۱	۳۹/۵	۲/۶	درصد کل	
۳۸	۱۷	۲۱	تعداد	کل
۱۰۰/۰	۴۴/۷	۵۵/۳	درصد کل	

در ۲۲ موردی که IHC منفی بود (۰/۱+)، در ۲ مورد (۹/۱٪) تقویت ژنی (کم و زیاد) وجود داشته و در ۲۰ مورد دیگر (۹۰/۹٪)، CISH منفی بوده است (جدول ۳).

کاذب) و توافق بین دو روش IHC و CISH در ۹۲/۱٪ موارد مشاهده شد. کاپا در این بررسی نشان دهنده توافق عالی بین دو روش بوده است ($P < 0.001$, $Kappa = 0.839$).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به ارزش وضعیت HER-2 به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی و نیز فاکتوری که نحوه پاسخ به درمان را پیش‌بینی می‌کند، ارزیابی دقیق این فاکتور ضروری است. روش‌های متفاوتی که برای این مهم وجود دارند، شامل CISH، FISH و IHC می‌باشند. IHC و FISH متداول‌تر بوده و دارای تأییدیه FDA هم می‌باشند.^{۱۴} در مطالعات مختلف هماهنگی قابل ملاحظه‌ای بین دو روش IHC و FISH گزارش شده است.^{۹،۷} IHC به عنوان یک روش سریع، آسان و مقرون به صرفه مورد قبول می‌باشد. ولی از سوی دیگر، در این روش متغیر بودن روش کار، آنتی‌بادی انتخاب شده، فقدان روش استاندارد برای تفسیر نتایج و متغیر بودن نتایج تفسیر بین مفسران متفاوت همگی بر ارزش این تست در تعیین وضعیت HER-2 به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی و پیش‌بینی کننده نتایج درمان تأثیر منفی دارند.

هم خوانی بین روش FISH و IHC در مطالعات زیادی گزارش شده است، هر چند که FISH در حال حاضر حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش برای HER-2 است.^{۹،۷} بسیاری از پاتولوژیست‌ها فرم مدیفیه آن را ترجیح می‌دهند. در این روش بررسی توسط میکروسکوپ نوری انجام می‌شود. در CISH، پایه و اساس مشابه FISH است،^{۱۱،۱۰} ولی دارای ویژگی‌هایی است که در FISH وجود ندارد. در CISH از پروب‌های DNA استفاده می‌شود، ولی نتایج از طریق واکنش آنزیماتیک که سبب تولید رنگ می‌شود (مثل IHC)، بررسی می‌شود. نتایج را می‌توان با سرعت بیشتر و با استفاده از وسایل ارزان‌تر (میکروسکوپ نوری) بررسی کرد. علاوه بر آن، برخلاف FISH، در CISH امکان بررسی بافت‌شناسی وجود دارد و اسلایدها را می‌توان برای مدت زمان طولانی در حرارت اطاق بایگانی کرد. هم‌خوانی بین IHC و CISH بسیار خوب می‌باشد.^{۱۳،۹،۷} در پاره‌ای از مطالعات، این روش‌ها در بیشتر از ۸۰٪ موارد با یکدیگر هم‌خوانی داشته‌اند. در پاره‌ای دیگر از مطالعات هم‌خوانی بین این دو روش ۱۰۰٪ نیز گزارش شده است.

به نظر می‌رسد که بیمارانی که تومور آنها در بررسی IHC مثبت ضعیف (۲+) گزارش شده است، بهترین کاندیدا برای بررسی HER-2 به روش CISH می‌باشند، تستی که در هر

توافق کلی بین IHC و CISH در ۹۲/۱٪ (۳۵ مورد) موارد وجود داشته است و کاپا، نشان دهنده توافق عالی بین این دو روش بوده است ($P < 0.001$ و $Kappa = 0.839$).

از ۳۸ تومور، در ۱۳ مورد (۳۴/۲٪)، HER-2 به روش IHC مثبت قوی (۳+)، در ۳ مورد (۷/۹٪)، مثبت ضعیف (۲+) و در ۲۲ مورد (۵۷/۹٪) منفی بوده است (۷ مورد (۱۸/۴٪) ۱+ و ۱۵ مورد (۳۹/۵٪) صفر). در همین گروه در ۱۲ مورد (۳۱/۶٪) تقویت ژنی به روش CISH با شدت زیاد، در ۵ مورد (۱۳/۲٪) با شدت کم و در ۲۱ مورد (۵۵/۳٪) منفی بوده است.

از ۱۳ موردی که در آن HER-2 به روش IHC مثبت قوی (۳+) بوده است، ۱۱ مورد (۸۴/۶٪) تقویت ژنی با شدت زیاد و در ۲ مورد (۱۵/۴٪) تقویت ژنی با شدت کم وجود داشته است. در هیچ موردی در این گروه تقویت ژنی منفی نبوده است.

از ۳ موردی که HER-2 به روش IHC مثبت ضعیف (۲+) بوده است، در یک مورد (۳۳/۳٪) تقویت ژنی با شدت زیاد، در ۱ مورد (۳۳/۳٪) تقویت ژنی با شدت کم وجود داشته و در ۱ مورد نیز (۳۳/۳٪) تقویت ژنی وجود نداشته است.

از ۷ موردی که HER-2 به روش IHC منفی (۱+) بوده است، در هیچ مورد تقویت ژنی با شدت زیاد دیده نشد که در ۱ مورد (۱۴/۳٪)، تقویت ژنی با شدت کم و در ۶ مورد (۸۵/۷٪)، تقویت ژنی منفی بود.

از ۱۵ موردی که HER-2 به روش IHC منفی (صفر) بوده است، هیچ موردی از تقویت ژنی شدید دیده نشد. در ۱ مورد (۶/۷٪)، تقویت ژنی دیده شد و در ۱۴ مورد (۹۳/۳٪) نیز تقویت ژنی وجود نداشته است (جدول ۲).

در هیچ کدام از بررسی‌ها به روش CISH یا IHC ارتباط معنی‌داری بین وضعیت ژن HER-2 با سن < 50 و ≥ 50 درجه بافت‌شناسی و گرید هسته رسپتورهای هورمونی (ER و PR) و اندازه تومور وجود نداشت.

در این بررسی، دو روش IHC و CISH در ۹۲/۱٪ موارد دارای توافق بوده‌اند. در رابطه با نتایج منفی (۱+) و مثبت (۳+ و ۲+) به دست آمده در IHC به ترتیب در مقابل فقدان و وجود تقویت ژنی (با شدت کم و زیاد) به دست آمده در CISH، از ۲۲ موردی که در آن HER-2 به روش IHC منفی بود، در ۲ مورد (۹/۱٪) تقویت ژنی با شدت کم در CISH مشاهده شد (منفی کاذب).

از ۱۶ موردی (۴۲/۱٪) که IHC مثبت بوده است (۳+، ۲+) در ۱۵ مورد (۹۳/۸٪) تقویت ژنی (کم و زیاد) وجود داشته است. تنها در یک مورد (۶/۳٪) تقویت ژنی وجود نداشته است (منفی

آزمایشگاه پاتولوژی قابل انجام است.^{۸۷و۳۹} در نهایت، CISH تست با ارزشی در بررسی وضعیت HER-2 می باشد.^{۱۶و۱۳و۱۵و۱۴} در روش هائی که بر پایه مشخص کردن تقویت ژنی مانند FISH و CISH استوار هستند، از آنجائی که نتایج به صورت تعداد متوسط کپی ژن بیان می شوند، کمی می باشند. این دو روش دارای توافق بسیار مطلوبی می باشند. بسیاری از محققین بین نتایج IHC و CISH توافق بسیار مطلوبی را گزارش کرده اند.^{۷و۸و۱۳}

آن مواردی از تومور که دارای تقویت ژنی با شدت کم هستند، بسیار بحث آفرین می باشند. زیرا این موارد بیشتر ناشی از آنوپلوئیدی ژن است تا تقویت ژنی. در این بررسی آزمایش از

نظر وجود آنوپلوئیدی در کروموزوم ۱۷ انجام نشد. علاوه بر این درجات کم تقویت ژنی در ژن می تواند در اثر حوادثی مثل تنظیم غیر عادی نسخه برداری و یا ترجمه ژن باشد که سبب تنظیم منفی پروتئین HER-2 و یا تغییر شاخص های آنتی ژنیک پروتئین HER-2 نیز باشد.

پاسخ به این سؤال که آیا مواردی که در آنها تقویت ژنی وجود دارد، ولی پروتئین HER-2 در IHC منفی است به درمان با Herceptin پاسخ می دهند، نامشخص است.

در جمع بندی نتایج، آزمون CISH به عنوان یک تست تکمیلی در بررسی وضعیت HER-2 در کارسینوم داکتال مهاجم پستان توصیه می شود.

Abstract:

Comparison between Immunohistochemistry and Chromogenic in Situ Hybridization Method in Assessment of HER-2 Status in Breast Cancer

Ensani F. MD^{}, Kargar M. MD^{**}, Davanloo M. MD^{***}
Irvanloo G. MD^{*}, Khazaeipour Z. MD^{****}*

(Received: 23 May 2009 Accepted: 14 Feb 2010)

Introduction & Objective: The epidermal growth factor receptor gene (HER-2) plays an important role in cell transformation and tumorigenesis. The presence of HER-2 gene generally predicts a good response to anthracycline-based agents and therapies that specifically target HER-2 (Herceptin).

Materials & Methods: Comparison between IHC and CISH methods for assessment of HER-2 status was performed on 38 women suffering from invasive ductal carcinoma. Data analysis was performed by pair wise grouped statistical method.

Results: There was a good correlation between IHC and CISH methods for assessment of HER-2 status in 92.1% of cases (Kappa=0.938, $P<0.001$).

Conclusions: CISH method is recommended as a complementary method in the assessment of HER-2 status in invasive ductal carcinoma of breast of those having weakly positive HER-2.

Key Words: Breast Cancer, Epidermal Growth Factor Receptor, Immunohistochemistry, Chromogenic in Situ Hybridization

^{*} Associated Professor of Pathology, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran

^{**} Resident of Pathology, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran

^{***} Pathologist, Danesh Pathobiology Laboratory, Tehran, Iran

^{****} Assistant Professor of Preventive and Community Medicine, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran

References:

1. Pothos A, Plastira K, Plastiras A, Vlachodimitropoulos D, Goutas N, Angelopoulou R: Comparison of chromogenic in situ hybridisation with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the assessment of her-2/neu oncogene in archival material of breast carcinoma. *Acta Histochem Cytochem* 2008, 41(3): 59-64.
2. Popescu NC, King CR, Kraus MH: Localization of the human erb B-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.2. *Genomics* 1989, 4: 362-366.
3. Peiro G, Aranda FI, Adrover E, Niveiro M, Alenda C, Paya A, Segui J: Analysis of HER2 by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry in lymph node-negative breast carcinoma: prognostic relevance. *Human Pathology* 2007, 38(1): 26-34.
4. Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA: Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994, 10: 251-337.
5. Hynes NE, Stern DF: The biology of erb B-2/neu/HER2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1198: 165-184.
6. Hoque A, Sneige N, Sahin AA.: Her-2/neu gene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11: 587-590.
7. Sinczak-Kuta A, Tomaszewska R, Rudnicka-Sosin L, Okon J, Stachura J: Evaluation of HER2/neu gene amplification in patients with invasive breast carcinoma. Comparison of in situ hybridization methods. *Pol J Pathol* 2007, 58(1): 41-50.
8. Todorovic-Rakovic N, Jovanovic D, Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D: Prognostic value of HER2 gene amplification detected by chromogenic in situ hybridization (CISH) in metastatic breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2007, 82(3): 262-268.
9. Zhang GH, Shi DR, Liang XM, Hou JH, Kang SY, Zhu WD, Li XB, Shao Y, Chen LR, Zhou Y: Comparison of HER2/neu oncogene detected by chromogenic in-situ hybridization and immunohistochemistry in breast cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2006, 35(10): 580-583.
10. Di Palma S, Collins N, Bilous M, Sapino A, mottotese M, Kapranos N, Schmitt F, Isola J: A quality assurance exercise to evaluate the accuracy and reproducibility of chromogenic in situ hybridisation for HER2 analysis in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008, 61(6): 757-760.
11. Van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, Hofmann M, Kristel P, Penault-Llorca F, Ruschoff J: Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Res* 2007, 9(5): R68.
12. Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL: Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: Immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int* 2008, 58(1): 17-25.
13. Shen DH, Wang FH, Yu YZ: Analysis of HER2 gene amplification and its protein expression in 165 cases of breast carcinoma: comparison of chromogenic in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2007, 36(7): 457-460.
14. Ni R, Mulligan AM, Have C, O'Malley FP: PGDS, a novel technique combining chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of ErbB2 (HER2/neu) status in breast cancer. *Appl immunohistochem Mol Morphol* 2007, 15(3): 316-324.
15. Di Palma S, Collins N, Faulkes C, Ping B, Ferns G, Haagsma B, Layer G, Kissin M, Cook M: Chromogenic in situ hybridization (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2007, 60(9): 1067-1068.
16. Li-Ning-T E, Ronchetti R, Torres-Cabala C, Merino MJ: Role of chromogenic in situ hybridization (CISH) in the evaluation of HER2 status in breast carcinoma: comparison with immunohistochemistry and FISH. *Int J Surg Pathol* 2005, 12(4): 343-351.